

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

Die Wirkung
von Inhibitoren der neutralen Leukozytenproteasen
auf das Sanarelli - Schwartzman - Phänomen
beim Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara Pfost aus Ulm
- 1980 -

1981

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

Die Wirkung von Inhibitoren der neutralen Leukozyten-
proteasen auf das Sanarelli - Schwartzman - Phänomen
beim Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara Pfof

aus
Ulm

- 1980 -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Graeff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.1981



INHALT

	Seite
<u>A. Einleitung:</u>	
1. Problemstellung:	1
1.1. Sanarelli-Schwartzman-Phänomen	1
1.2. Proteaseninhibitoren	2
2. Aufgabenstellung bzw. Zielsetzung der Arbeit	3
<u>B. Material und Methoden:</u>	4
1. In vitro Vorversuche zur Hemmung von Leukozytenelastase:	4
1.1. Substanzen und Lösungen	4
1.2. Durchführung	5
2. Tierexperimentelle Untersuchungen:	5
2.1. Versuchsanordnung	5
2.2. Substanzen	8
2.2.1. Antikoagulans	8
2.2.2. Endotoxin	8
2.2.3. Bowman-Birk-Inhibitor und Eglin	8
3. Hämatologische Untersuchungen:	9
3.1. Blutentnahme und -verarbeitung	9
3.2. Leukozyten	9
3.3. Thrombozyten	9
3.4. Fibrinogen	9
3.5. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK)	9
3.6. Antithrombin III	9
3.7. Gerinnungsfaktor XIII	10
4. Pathologische Untersuchung	10
5. Statistische Auswertung	10
<u>C. Ergebnisse:</u>	11
1. In vitro Vorversuche:	11

1.	In vitro Vorversuche:	11
1.1.	Bowman-Birk-Inhibitor	12
1.2.	Eglin	13
2.	Tierexperimentelle Versuche:	14
2.1.	Leukozyten	14
2.2.	Thrombozyten	15
2.3.	Fibrinogen	17
2.4.	Lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK)	18
2.5.	Antithrombin III (AT III)	19
2.6.	Gerinnungsfaktor XIII	21
2.7.	Weitere Bestimmungen und Beobachtungen an Kontrolltieren (nur Inhibitor)	22
3.	Pathologisch - morphologische Ergebnisse	23

<u>D. Diskussion</u>	26
----------------------	----

<u>E. Zusammenfassung</u>	33
---------------------------	----

<u>F. Literatur</u>	34
---------------------	----

A. Einleitung

Für den Kliniker zählt auch heute die Behandlung der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIG) bei den verschiedenen Schockformen und anderen Krankheitsbildern (Fruchtwasserembolie, intrauteriner Fruchttod, infizierter Abort, Eklampsie, Purpura fulminans, Meningokokkensepsis - um nur einige zu nennen) zu den wesentlichen therapeutischen Problemen (12).

Die disseminierte intravaskuläre Gerinnung führt durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren zur hämorrhagischen Diathese und durch den Ausfall von Fibrin in der terminalen Strombahn zur Störung der Mikrozirkulation mit Organnekrosen. Die fibrinreichen Mikrothromben sind das morphologische Äquivalent der DIG. Sie entstehen am Ende eines kaskadenförmigen Gerinnungsablaufs im Blut, bei dem unter dem Einfluß von Thrombin Fibrinogen in Fibrin umgewandelt wird. Erste Vorstufen der Umwandlung sind die noch löslichen Fibrinmonomerkomplexe, die einen wichtigen Parameter für das Erkennen von intravaskulären Gerinnungsvorgängen darstellen.

Das Ziel der derzeitigen Therapie ist die Behandlung der Grundkrankheit, die Unterbrechung des intravaskulären Gerinnungsvorgangs und die Substitution plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Neue Wege in der Behandlung des Sanarelli-Schwartzman-Phänomens (SSP) eröffnet die Verwendung von Hirudin, einem spezifischen Inhibitor des Thrombin (10). Trotzdem sind die morphologischen und funktionellen Schäden an Lunge, Niere und Leber, ausgelöst durch Hämorrhagien, Mikrogerinnsel und Gewebnekrosen, nur teilweise reversibel.

In den zwanziger Jahren entwickelten Sanarelli und Schwartz-

man (23) ein tierexperimentelles Modell des Endotoxinschocks beim Kaninchen. Die Auslösung eines experimentellen Endotoxinschocks durch die zweimalige Injektion bestimmter bakterieller Stoffe im Abstand von 24 Stunden bezeichnet man deshalb als "generalisiertes Schwartzman-Phänomen" (1). Da die hämatologischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen denen beim Menschen am ehesten vergleichbar sind, scheint dieses Modell für pharmakologische Untersuchungen besonders geeignet.

In meiner Arbeit untersuchte ich die Wirkung zweier Proteinaseinhibitoren auf die DIG am generalisierten Sanarelli-Schwartzman-Phänomen (SSP).

Proteinaseinhibitoren werden in der Literatur zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen vorgeschlagen. Untersucht wurde ihre entzündungshemmende Wirkung u.a. bei Morbus Crohn (2) und der akuten Pankreatitis, die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes beim Schock u.a. durch Hemmung der Fibrinolyse, die Abschwächung der Gefäßpermeabilität und ihre Wirkung beim Endotoxinschock (24).

Bei meinen Untersuchungen verwandte ich zwei verschiedene natürliche Inhibitoren, den Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) aus Sojabohnen (21) und das Eglin aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* (22).

Das Hemmspektrum beider Inhibitoren umfaßt Trypsin, Chymotrypsin und die neutralen Granulozytenproteasen Elastase und Kathepsin G.

Diese Granulozytenproteasen werden u.a. durch Endotoxin aus den zytoplasmatischen Granula der neutrophilen Leukozyten freigesetzt. Die Granulozyten besitzen die wichtige Eigenschaft der Phagozytose und Chemotaxis. Die Enzyme aus den Granula dienen der Verdauung von phagozytierten Mikroorganismen in den Leukozyten; bei extrazellulärer Degranulation bauen sie außerdem Antigen-Antikörper-Komplexe, Gewebsproteine und Gerinnungsfaktoren proteolytisch ab (7).

Der Organismus hat zahlreiche physiologische Inhibitoren mit z.T. spezifischer Hemmwirkung gegen Elastase und Kathepsin G, vorwiegend im Plasma - das sind α_1 -Antitrypsin, α_1 -Makroglobulin und α_1 -Antichymotrypsin -, in den Sekreten von Nase, Bronchien, Cervix und im Seminalplasma (20). Diese natürlichen Antagonisten sollen den Körper vor "Selbsterstörung" in Form schwerer Gewebeschädigung schützen. Bei Inhibitorenmangel oder plötzlicher Enzymfreisetzung durch Endotoxin o.ä. ist der natürliche Kontrollmechanismus gestört, das kann z.B. zu Lungenemphysem (14), Glomerulonephritis, rheumatischen und arthritischen Krankheiten und Hämorrhagien führen.

Das Ziel einer Therapie des SSP mit Granulozytenproteaseninhibitoren wie BBI oder Eglin ist eine geringere Gewebeschädigung, vor allem in Lunge und Niere - dadurch Besserung der Prognose der schockinduzierten respiratorischen und renalen Insuffizienz - und ein verminderter Abbau verschiedener Gerinnungsfaktoren durch die unspezifische Proteolyse.

B. Material und Methoden:

1. In vitro Vorversuche zur Hemmung von Leukozyten-elastase

Um genauere Vorstellungen von der Hemmwirkung der beiden verwendeten Inhibitoren zu erhalten, wurden in vitro Vorversuche mit Leukozytenelastase durchgeführt.

Bedingungen:

Kinetische Messung bei 25°C und 405 nm unter Verwendung des chromogenen Substrates SANA (4, 20, 21).

1.1. Substrate und Lösungen:

1.1.1. 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7

1.1.2. 0,2 M Triäthanolamin HCl, pH 7,8 (TÄ)

1.1.3. SANA (Suc(Ala)₃NHNP : 3-Carboxypropionyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin p-Nitroanilid; Protein Research Foundation, Japan, Art.Nr. 740813, bezogen von der Firma Paesel GmbH, Frankfurt) (4)

Einwaage: 6,75 mg gelöst in 10 ml TÄ

1.1.4. Leukozytenelastase, MG 34500

Geschenk von Frau Dr. Jochum, Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München. Darstellung siehe (20).

1.1.5. Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) aus Sojabohnen, MG ca.8000

Geschenk von Frau Dr. Jochum

Einwaage: 41 µg/ml in Tris-HCl-Puffer

1.1.6. Eglin b aus Blutegeln, MG ca. 6700

Darstellung siehe (22).

Geschenk von Frau Dr. Seemüller

Einwaage: 41 µg/ml in Tris-HCl-Puffer

1.2. Durchführung:

Die kinetischen Messungen wurden mit einem Eppendorf-Photometer bei 25°C Arbeitstemperatur unter Verwendung eines Filters von 405 nm und Plastikkuvetten (1 cm Schichtdicke, 3 ml Volumen) durchgeführt.

Konstante Mengen von Elastase, gelöst in 0,001 n HCl, und steigende Mengen von Inhibitor, gelöst in neutralem Tris-puffer, wurden mit 0,2 M Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 7,8 in Küvetten zu einem Endvolumen von 2 ml gemischt. Diese Mischung wurde zur Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes 10 Minuten bei 25°C vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Substratlösung (0,65 mg SANA/ml, pH 7,8) wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Die Hydrolyse des Substrates wurde bei 405 nm für etwa 30 Minuten verfolgt.

Die Extinktionsdifferenz pro 10 Minuten wurde für jede Inhibitor-Versuchsreihe graphisch dargestellt und daraus die entsprechende Inhibitorkonzentration für 50prozentige Hemmung abgelesen.

2. Tierexperimentelle Untersuchungen:

2.1. Versuchsanordnung:

Für das Modell des Sanarelli-Schwartzman-Phänomens wurden 35 nicht schwangere, weibliche Kaninchen mit einem Gewicht von 2,3 bis 3,3 kg verwendet.

Die Tiere wurden mit Kaninchentrockenfutter und Trinkwasser ad libitum gefüttert.

Die Methode von A. Ishikawa (9) wurde modifiziert übernommen. Am ersten Versuchstag wurde das Blut mit einem 20G-Abocath-T (0,61 mm I.D., 3,2 cm lang) aus der lateralen Ohrvene entnommen, das Endotoxin und/oder die Proteaseninhibitoren auf gleichem Wege injiziert. So konnten die Kaninchen in ihrem Käfig bleiben. Nach 24 Stunden wurde per Venaesection ein Polyäthylenkatheter von 1,5 mm Durchmesser und 15 cm Länge

in die äußere Jugularvene eingesetzt. Der Venenkatheter ermöglichte zweistündliche Blutabnahmen.

Zur Technik der Venaesectio: Nach Desinfektion und Lokal-anästhesie mit 4 ml 1%igem Xylocain wird die Vena jugularis durch eine ca. 3 cm lange Incision parallel zur Trachea - im Abstand von 1 cm - dargestellt. Die äußere Gabel wird freipräpariert und nach cranial unterbunden. Der caudal gelegene Venenabschnitt wird mit einem losen Faden angeschlungen und angehoben. Die Vene wird durch einen Einschnitt im Winkel von 60° eröffnet, der Kunststoffkatheter ca. 7 cm weit eingeführt, so daß er bis in die Vena cava superior reicht. Zur Befestigung dient eine proximale Ligatur über Katheter und Vene. Der Schnitt wird durch eine durchgehende Hautnaht verschlossen (Abb.1).

Blutabnahmen erfolgten vor der ersten Endotoxininjektion und 2 Stunden danach, vor der zweiten Endotoxininjektion (d.h. nach 24 Stunden), sowie nach 26, 28 und 30 Stunden (Abb.2). Pro Abnahme wurden 7 ml Blut entnommen. Zur Bestimmung der Leukozyten, Thrombozyten, des Hb und HK wurde 1 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen gegeben. Für die Untersuchung des Fibrinogen- und LFMK-Spiegels wurde in einer Einmalspritze 0,5 ml Antikoagulans (siehe 2.2.1.) (6) vorgelegt und mit Blut auf 5 ml aufgezogen. Citratblut (0,1 ml 3,8% Natriumcitrat und 0,9 ml Blut) wurde zur Ermittlung der AT III-, Antiplasmin- und Faktor XIII-Werte verwendet. Die ersten Proben wurden in einer Kühlzentrifuge bei $2500 \times g$ und $5000 \times g$ zentrifugiert, das Citratblut bei $2000 \times g$. Das Plasma wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-25^{\circ}C$ eingefroren.

Um das entstehende Volumendefizit auszugleichen und den Venenkatheter offenzuhalten, wurde eine 1:1-Lösung aus 5-prozentiger Glucose und physiologischer Kochsalzlösung mit einer Geschwindigkeit von 5,4 ml/h (Braun-Melsungen-Perfusor-Pumpe) über einen Zeitraum von 6 Stunden in-

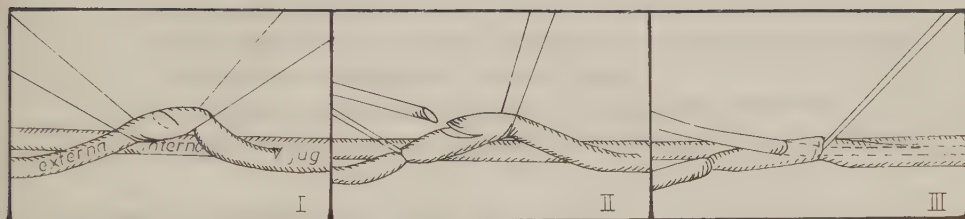


Abb.1 Technik der Venaesection

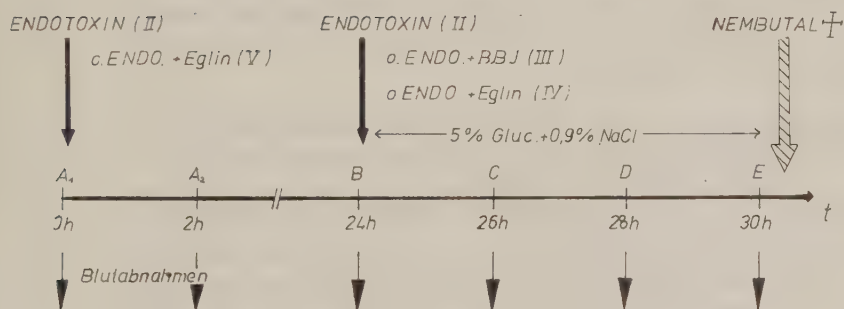


Abb.2 Versuchsschema für das Kaninchen-Modell

fundiert.

Alle Tiere wurden sofort nach der letzten Blutabnahme durch eine Überdosis Nembutal (Pentobarbital Natrium von Abbott - 60 mg/ml) getötet. Anschließend wurden sie obduziert. Mittels Medianschnitt wurde der Brust- und Bauchraum eröffnet, Niere, Leber und Lunge entnommen. Zur Fixierung wurden die Präparate in ca. 5 mm dicke Scheiben geschnitten und in 10%igem Formalin eingelegt.

Das generalisierte Schwartzman-Phänomen wurde durch zweimalige Injektion von Endotoxin im Abstand von 24 Stunden ausgelöst.

Die 35 Versuchstiere wurden auf folgende Gruppen verteilt:

Gruppe I (n=3) bekam 5%ige Glucose- und 0,9%ige Kochsalzlösung (im Verhältnis 1:1) verabreicht. Diese Tiere dienten der Überprüfung des Versuchsablaufs und der Methodik. Dieses Normalkollektiv wird im folgenden nicht mehr aufgeführt.

Gruppe II (n=8) ist die eigentliche Kontrollgruppe. Die Tiere erhielten nur Endotoxin injiziert, im Anschluß an die 2. Injektion wurde ihnen eine reine Glucose - Kochsalzlösung infundiert.

Gruppe III (n=8) sowie Gruppe IV (n=6) wurde nach der 2. Endotoxininjektion mit BBI bzw. Eglin behandelt.

Gruppe V (n=6) bekam bei beiden Injektionen Endotoxin und Eglin gleichzeitig.

Um die alleinige Wirkung von BBI bzw. Eglin am Kaninchen zu beobachten, erhielten jeweils zwei Tiere nur einen Proteaseninhibitor.

2.2. Substanzen:

2.2.1. Antikoagulans:

3,8 g tri-Natriumcitrat-2 hydrat, p.A.
1,38 g TES (= Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2 amino-
äthan sulfonsäure) p.A.
1,86 g Na₂EDTA- 2 hydrat
100.000 KIU Trasylol (=Aprotinin)
in destilliertem Wasser lösen, mit 1n NaOH auf
pH 7,5 einstellen, und auf 100 ml auffüllen

2.2.2. Endotoxin:

Das verwendete Endotoxin - Lipopolysaccharid B aus
E. coli 055:B5 von den Difco-Laboratorien in Detroit -
wurde in sterilem, destilliertem Wasser gelöst und
zusammen mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert
(100 µg/ml).

Zur Auslösung der disseminierten intravaskulären
Gerinnung benötigte man 60 - 75 µg Endotoxin / kg Tier-
gewicht. Wie von anderen Untersuchern (3) bereits
festgestellt, steigt die Empfindlichkeit der Kanin-
chen auf Endotoxin im Sommer stark an. Bei hoch-
sommerlichen Temperaturen reichte daher die Hälfte
der obengenannten Menge zur Erzeugung eines Endo-
toxinschocks.

2.3.2. Bowman-Birk-Inhibitor und Eglin:

Die Proteinaseinhibitoren Bowman-Birk-Inhibitor (BBI)
und Eglin wurden in physiologischer Kochsalzlösung
gelöst (bei Eglin war vorheriges Ansäuern mit HCl
erforderlich) und auf einen pH-Wert von 7,3 - 7,4 ein-
gestellt (verdünnung: BBI 5 mg/ml; Eglin: 1 mg/ml).
Die Höhe der Dosierung des BBI wurde entsprechend
der Erfahrungen von J.Witte (25) gewählt, d.h. durch-
schnittlich wurden 5 mg/ kg Körpergewicht ($\hat{=}$ ca.
17 IU/kg) appliziert.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche erschien ein Fünftel der BBI-Gewichtsmenge an Eglin ausreichend, um die gleiche Hemmwirkung zu erzielen. Die verabreichte Inhibitormenge betrug daher durchschnittlich 1 mg Eglin/ kg Körpergewicht.

3. Hämatologische Untersuchungen

Das Blut wurde in der bereits beschriebenen Weise abgenommen und verarbeitet.

3.2. Leukozyten:

Die Leukozytenzählung erfolgte mittels eines elektronischen Zählgeräts (Coulter Counter von Dunstable).

3.3. Thrombozyten:

Die Thrombozytenzahl wurde in der üblichen Weise mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops in der Neubauerzählkammer ermittelt (16).

3.4. Fibrinogen:

Fibrinogen wurde nach der von Hafter und Graeff (6) modifizierten Methode nach Blombäck und Blombäck bestimmt.

3.5. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe:

Die löslichen Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) sind wichtige Parameter der Aktivierung der Hyperkoagulabilität und der intravasalen Gerinnung. Der Prozentgehalt bezogen auf Fibrinogen läßt sich mittels Agarosegelfiltration nach Hafter und Graeff (6) bestimmen.

3.6. Antithrombin III:

Antithrombin III wurde mit dem Substrat Chromozym TH

nach den Vorschriften der Firma Boehringer, Mannheim bei einer Temperatur von 37°C bestimmt.

3.7. Gerinnungsfaktor XIII:

Die enzymatische Aktivität des fibrinstabilisierenden Faktor XIII wurde mit dem Faktor XIII-Schnellreagenz der Firma Behringwerke, Marburg, festgestellt.

4. Pathologische Untersuchungen:

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die 0,5 cm dicken Gewebescheiben mindestens 48 Stunden in 10%igem neutralen Formalin fixiert und mit Hilfe des Autotechnikon Mono (Technikon Corporation New York/USA) in Parablast gebettet. Mit dem Mikrotom wurden ca. 5 μ dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Für die mikroskopische Beurteilung wurden die Präparate routinemäßig mit Hämalaun und Eosin gefärbt und anschließend mit Eukitt und einem Deckglas eingedeckt. Die Nierengewebsschnitte wurden außerdem mit PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) gefärbt. Für die besondere Darstellung des Fibrins wurde zusätzlich die modifizierte Fibrinfärbung nach Ladewig verwendet. Für nähere Angaben über die mikroskopische Technik siehe Romeis, Benno: Mikroskopische Technik. (18)

5. Statistik:

Zur statistischen Auswertung aller erhaltenen Daten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests nach Student geprüft (19). Dabei wurde die Gruppe der Kontrolltiere, die nur Endotoxin erhalten hatte, einzeln mit den mit Proteaseninhibitor behandelten Gruppen verglichen. Ein unter 0,05 liegender p-Wert wurde als signifikant angesehen.

C. Ergebnisse:

1. In vitro Vorversuche:

Die Inhibitionsversuche ermöglichen einen quantitativen Vergleich der Hemmwirkungen der beiden Proteaseninhibitoren gegenüber der Leukozytenelastase.

Im einzelnen sind die Reaktionsansätze und die gemessenen Extinktionsdifferenzen für das Hemmverhalten des BBI der Tabelle 1 und der dazugehörigen graphischen Darstellung (Abb.3) zu entnehmen. Die entsprechenden Werte für Eglin stehen in Tabelle 2 und Abbildung 4.

Die graphische Darstellung der Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration zeigt, daß die Aktivität der Leukozytenelastase durch BBI bei einem Enzym-Inhibitor-Verhältnis von ca. 1:5 (Gew./Gew.) bzw. 1:21,4 (Mol/Mol) vollständig gehemmt wird. Bei Eglin wurde vollständige Hemmung bei 1:0,2 (Gew./Gew.) bzw. 1:1 (Mol/Mol) beobachtet.

50%ige Hemmung erfolgte durch BBI bei ca. 1:0,75 (Gew./Gew.) bzw. 1:3,34 (Mol/Mol) und durch Eglin bei 1:0,04 (Gew./Gew.) bzw. 1:0,2 (Mol/Mol).

Ein Vergleich der beiden Hemmaktivitäten zeigt, daß bei gleicher Menge (molar und gewichtsmäßig) Eglin die 20-fache Inhibitorwirkung des BBI besitzt.

Tab. 1

Reaktionsansätze zur Bestimmung der Hemmwirkung von Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) auf Leukozytenelastase (s. unter B 1.2.)

Leukozytenelastase			BBI			Tris	SANA	$\Delta E/10'$
ml	μg	nM	ml	μg	nM	ml	ml	
1,0	4,1	0,12	-			1,0	1,0	0,024
"	"	"	0,01	0,4		0,99	"	0,018
"	"	"	0,05	2,0		0,95	"	0,012
"	"	"	0,1	4,1	0,517	0,9	"	0,011
"	"	"	0,2	8,2		0,8	"	0,009
"	"	"	0,3	12,3		0,7	"	0,007
"	"	"	0,4	16,4		0,6	"	0,004
"	"	"	0,5	20,5	2,585	0,5	"	0,001

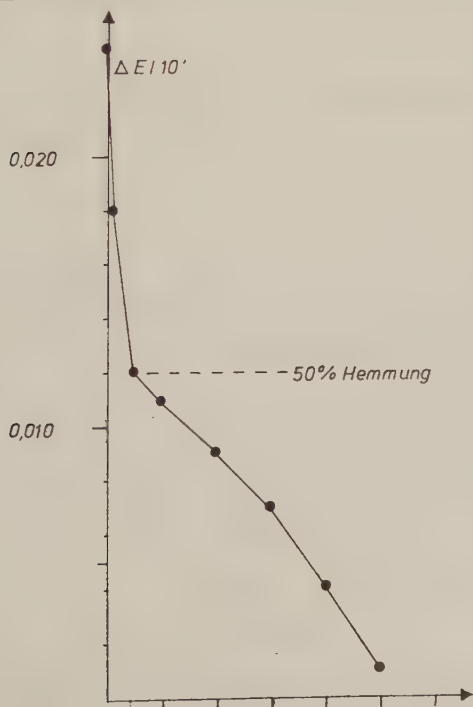


Abb. 3
Hemmung von
Leukozytenelastase
durch BBI

Tab. 2

Reaktionsansätze zur Bestimmung der Hemmwirkung von Eglin auf Leukozytenelastase (s. unter B 1.2.)

Leukozytenelastase			Eglin			Tris	SANA	$\Delta E/10'$
ml	μg	nM	ml	μg	nM	ml	ml	
1,0	4,1	0,12	-			1,0	1,0	0,019
"	"	"	0,02	0,082	0,0122	0,98	"	0,0144
"	"	"	0,05	0,207	0,0309	0,95	"	0,008
"	"	"	0,1	0,414	0,062	0,9	"	0,0044
"	"	"	0,15	0,621	0,092	0,85	"	0,0024
"	"	"	0,2	0,82	0,122	0,8	"	0,000
"	"	"	0,4	1,64	0,244	0,6	"	0,000

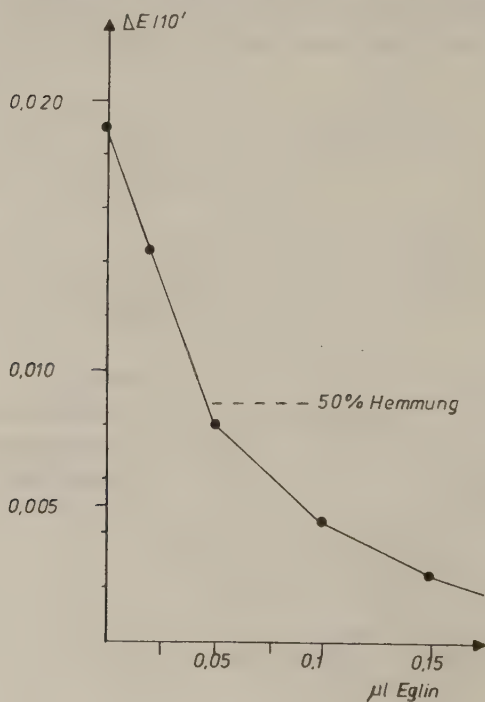


Abb. 4
Hemmung von
Leukozytenelastase
durch Eglin

2. Tierexperimentelle Versuche:

2.1. Leukozyten:

Die graphische Darstellung (Abb.5) zeigt deutlich den typischen Leukozytenverlauf beim generalisierten Schwartzman-Phänomen. Charakteristisch sind der schnelle starke Abfall auf Werte unter $2000/\mu\text{l}$ und die Entwicklung einer reaktiven Leukozytose mit Anstieg auf über $10000/\mu\text{l}$ nach 24 Stunden (der p-Wert liegt durchschnittlich bei 0,001).

Die Werte (Tab.3) der behandelten Gruppen (III, IV und V) verhalten sich dabei gleich wie die der Kontrollgruppe (II). Ausgenommen davon ist der 2-Stunden-Wert der mit Endotoxin und Eglin gleichzeitig behandelten Gruppe (V), hier ist der Leukozytenabfall signifikant geringer ($p < 0,05$) als bei der Kontrollgruppe.

Tab. 3

Mittelwerte ($10^{-3}/\mu\text{l}$) und Standardabweichungen der Leukozyten

	A ₁ (0h)	A ₂ (2h)	B (24h)	C (26h)	D (28h)	E (30h)
II	$7,8 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,3$	$12,5 \pm 6,5$	$2,0 \pm 0,5$	$3,1 \pm 1,1$	$4,1 \pm 1,0$
III	$5,7 \pm 2,6$	$1,6 \pm 0,5$	$10,3 \pm 5,5$	$2,5 \pm 2,7$	$3,8 \pm 2,9$	$5,5 \pm 4,0$
IV	$7,1 \pm 1,2$	$1,5 \pm 0,6$	$12,1 \pm 4,7$	$2,9 \pm 1,3$	$3,3 \pm 1,5$	$4,7 \pm 1,9$
V	$11,0 \pm 4,1$	$2,6 \pm 1,0$	$8,8 \pm 2,6$	$3,6 \pm 2,5$	$4,0 \pm 2,8$	$5,2 \pm 2,8$

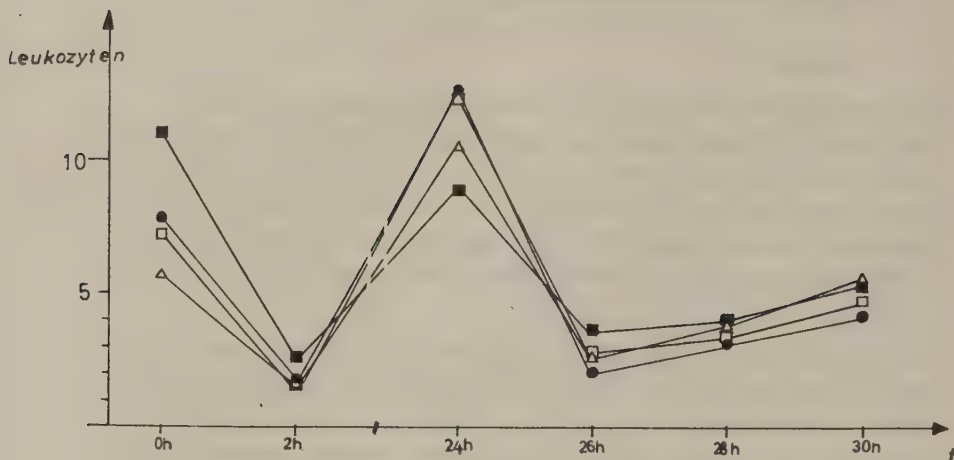


Abb. 5 Verlauf der Leukozyten

● ohne Inhibitor, nur Endotoxin (II)

△ Endotoxin und BBI (III)

□ Endotoxin und Eglin nach der 2. Endotoxininjektion (IV)

■ Endotoxin und Eglin nach 1. und 2. Endotoxininjektion (V)

2.2. Thrombozyten:

Bei allen Tieren (II - V) sind am Ende des Experiments nur noch 20% des Ausgangswertes an Thrombozyten im Blut ($p < 0,0001$). Die Zahl der Plättchen (Tab. 4 und Abb. 6) fällt während des Versuchs kontinuierlich ab. Bei den mit BBI behandelten Tiere (III) zeigt die Kurve deutlich niedrigere Werte ($p \leq 0,05$) in C und D, die Endwerte unterscheiden sich nicht von denen der anderen Gruppen.

Auffälligerweise wurden bei den zwei Tieren, die nur BBI erhielten (s.S. 7), ebenfalls sinkende Thrombozytenzahlen beobachtet, bei im übrigen unveränderten Werten dem Normalkollektiv gegenüber.

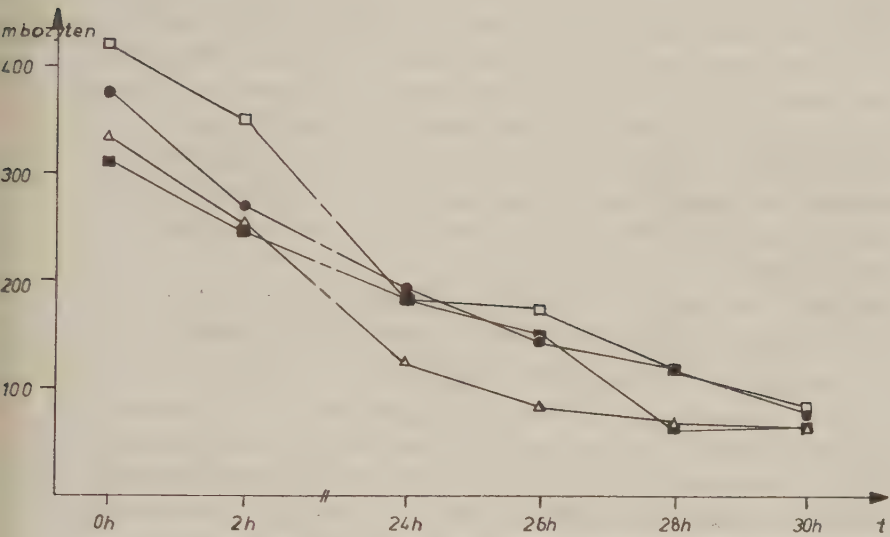


Abb. 6 Verlauf der Thrombozyten

Tab. 4

Mittelwerte ($10^{-3}/\mu l$) und Standardabweichungen der Thrombozyten

	A ₁ (0h)	A ₂ (2h)	B (24h)	C (26h)	D (28h)	E (30h)
II	375 ± 41	269 ± 81	194 ± 62	145 ± 42	120 ± 57	77 ± 37
III	335 ± 81	256 ± 88	126 ± 52	81 ± 28	70 ± 24	64 ± 29
IV	421 ± 178	350 ± 125	184 ± 60	173 ± 59	122 ± 90	85 ± 36
V	312 ± 53	247 ± 57	185 ± 51	152 ± 66	67 ± 21	63 ± 17

2.3. Fibrinogen:

Der Plasmafibrinogenspiegel war bei allen vier Gruppen 2 Stunden nach der 1. Endotoxininjektion unverändert normal (Werte A_1 : A_2 nicht signifikant). Erst nach 24 Stunden zeigten die Werte der Gruppen II, III und IV einen deutlichen Anstieg ($p < 0,001$). Die Fibrinogenspiegel kehrten in diesen Gruppen bis zum Ende des Experiments auf das anfängliche Niveau zurück (Werte A : E nicht signifikant).

Wie auch aus Tabelle 5 und Abb. 7 ersichtlich, besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen II, III und IV.

Das Verhalten der Werte der Gruppe V - die Tiere hatten Endotoxin und Eglin gleichzeitig erhalten - wich deutlich von den anderen ab. Die Werte schwankten während des gesamten Versuchsablaufs in einem Bereich, der keine signifikanten Unterschiede zeigte. Die 24- und 26-Stundenwerte waren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,02$ bzw. $< 0,01$).

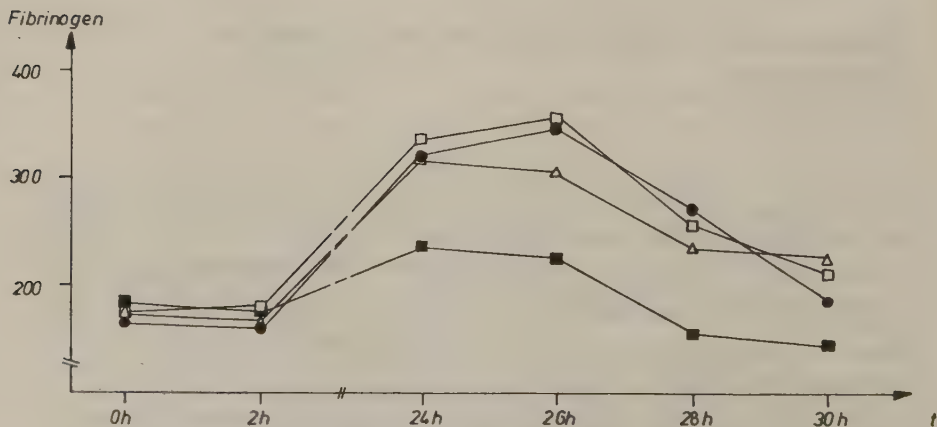


Abb. 7 Verlauf des Fibrinogenspiegels im Plasma

Tab.5

Mittelwerte (mg%) und Standardabweichungen des Fibrinogens

	A ₁ (0h)	A ₂ (2h)	B (24h)	C (26h)	D (28h)	E (30h)
II	166 ±39	158 ±45	320 ±90	345 ±82	270 ±68	181 ±79
III	173 ±68	164 ±60	317 ±65	305 ±85	237 ±70	225 ±57
IV	175 ±76	182 ±80	334 ±62	353 ±43	254 ±106	209 ±95
V	185 ±47	177 ±68	236 ±62	223 ±76	151 ±66	148 ±106

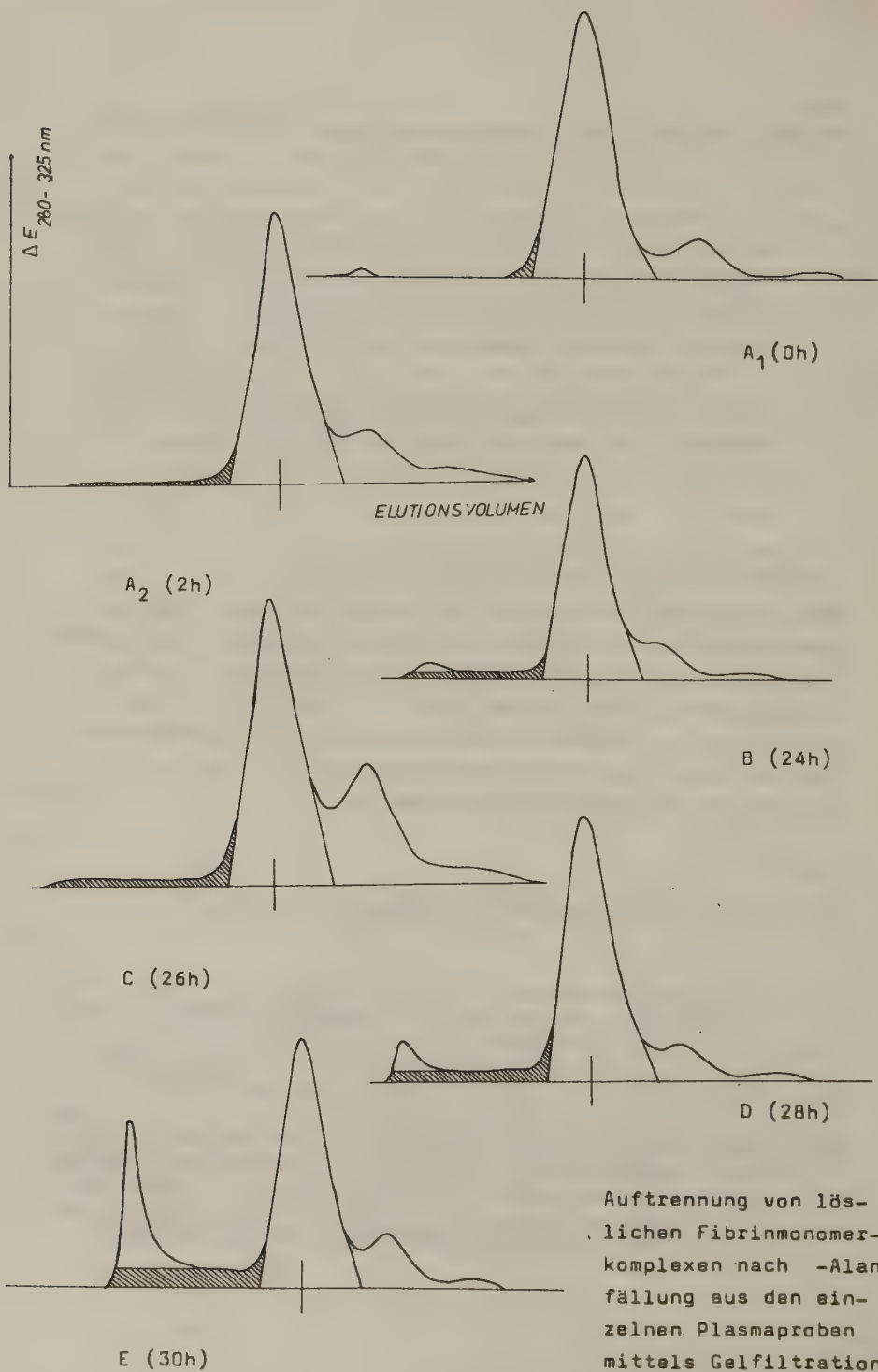
2.4. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK):

Der relative Gehalt von LFMK in Prozent des Gesamtfibrinogens stieg bei allen Gruppen (II-V) signifikant an ($p < 0,001$). Die Endwerte betrugen durchschnittlich das Dreifache des Ausgangswertes; die genauen Daten sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die dazugehörigen Kurven sind in Abb.8 dargestellt. Die mit Eglin oder BBI behandelten Gruppen weichen nicht signifikant von der Kontrollgruppe ab.

Tab.6

Mittelwerte und Standardabweichungen der LFMK-Werte

	A ₁ (0h)	A ₂ (2h)	B (24h)	C (26h)	D (28h)	E (30h)
II	4,0 ±1,1	5,5 ±1,7	7,6 ±1,7	9,9 ±2,1	13,1 ±3,0	15,2 ±4
III	3,9 ±2,7	5,0 ±4,5	7,6 ±1,8	11,0 ±5	12,1 ±1	11,3 ±4
IV	3,2 ±0,6	5,6 ±2,1	7,1 ±3,6	9,6 ±5,5	10,2 ±2,8	11,2 ±4
V	3,0 ±0,5	5,4 ±2,5	6,5 ±4	12,8 ±5	15,6 ±4,6	17,3 ±8



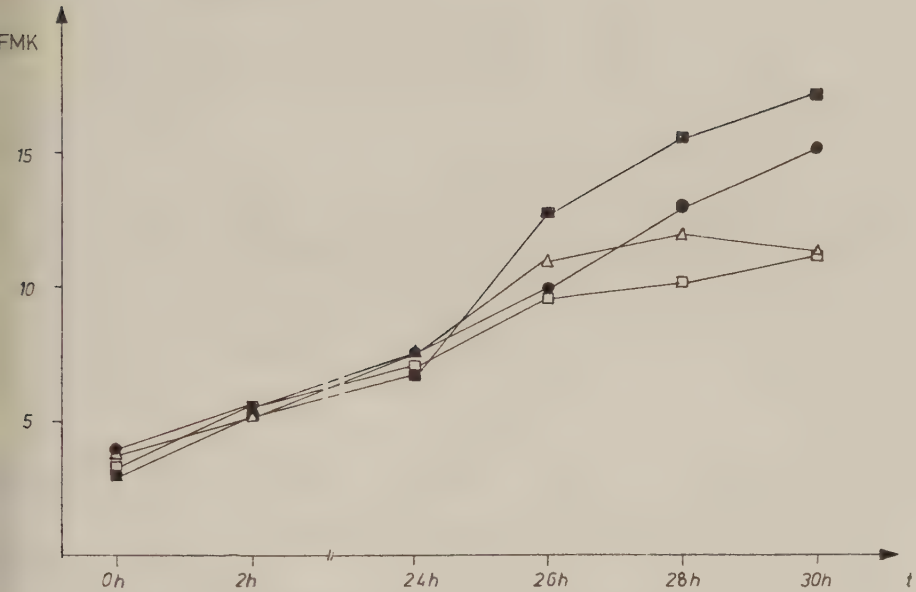


Abb. 8 Verlauf der LFMK-Werte in Prozent des Gesamtfibrinogens

2.5. Antithrombin III:

Bis zum Ende des Versuchsablaufs fällt die AT III - Konzentration im Plasma der Tiere, die nur Endotoxin erhielten, linear ab ($p < 0,0001$). Bei den mit Proteaseninhibitoren behandelten Tieren ist statistisch kein Abfall festzustellen (Werte der Gruppe III: $A_1:A_2$ n.s., $A_1:B$ n.s., $A_1:C$ n.s., $A_1:D$ n.s., $A_1:E$ n.s.; Werte der Gruppe IV: $A_1:A_2$ n.s., $A_1:B$ n.s., $A_1:C$ n.s., $A_1:D$ n.s., $A_1:E$ n.s.; Werte der Gruppe V: $A_1:A_2$ n.s., $A_1:B$ n.s., $A_1:C$ n.s., $A_1:D$ $p < 0,01$, $A_1:E$ n.s.), was in der graphischen Darstellung (Abb.9) nicht deutlich herauskommt. Der 30-Stunden-Wert ist bei den behandelten Gruppen signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ($II_E:III_E$ $p < 0,05$; $II_E:IV_E$ $p < 0,02$; $II_E:V_E$ $p < 0,01$).

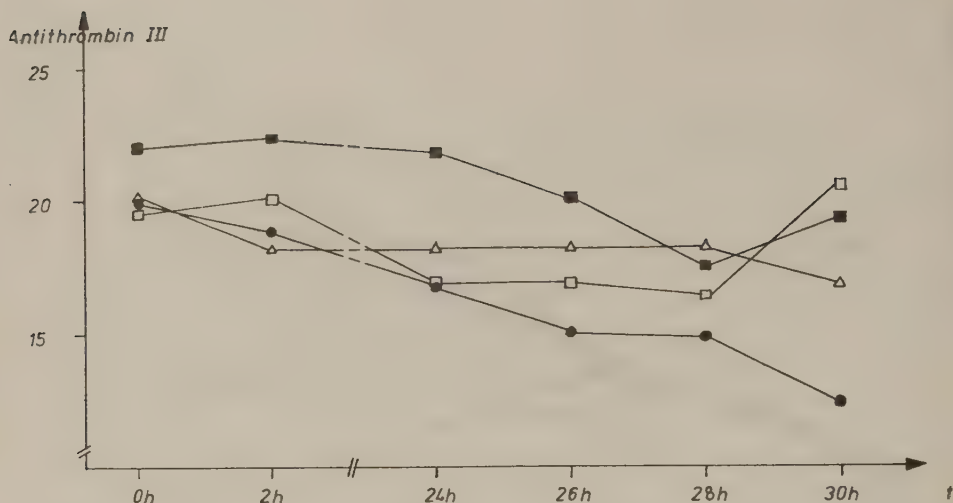


Abb. 9 Verlauf des AT III-Spiegels im Plasma

Tab. 7 Mittelwerte und Standardabweichungen der AT III -
Konzentration im Plasma

	A ₁ (0h)	A ₂ (2h)	B (24h)	C (26h)	D (28h)	E (30h)
II	19,9±1,7	18,8±1,7	16,7±3,0	15,1±2,7	14,9±3,2	12,4±3,5
III	20,1±2,6	18,1±2,0	18,1±3,0	18,1±3,5	18,1±5,3	16,8±3,8
IV	19,5±4,4	20,1±2,5	16,9±5,5	16,7±5,5	16,3±4,2	20,2±6,6
V	22,0±1,4	22,3±2,9	21,7±3,1	19,9±3,6	17,5±2,6	19,2±3,9

2.6 Gerinnungsfaktor XIII:

Wie aus der graphischen Darstellung (Abb.10) bereits hervorgeht, sinkt der Gehalt an Faktor XIII im Plasma aller Tiere ($p_{II,III \text{ und } IV} \ll 0,0001$; $p_V < 0,001$) signifikant ab.

Bei der statistischen Auswertung ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Der Faktor XIII-Spiegel ist gegen Ende des Versuchs bei Gruppe III, IV und V höher als bei der Kontrollgruppe II ($II_E:III_E \ p < 0,01$; $II_E:IV_E \ p < 0,05$; $II_D:V_D \ p < 0,05$; $II_E:V_E \ p < 0,01$).

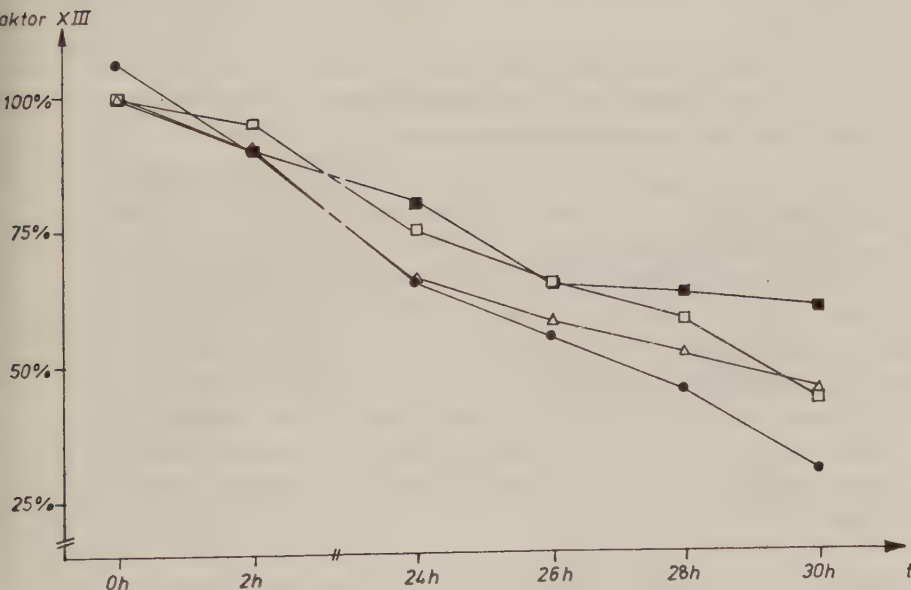


Abb.10 Verlauf des Faktor XIII - Gehalts im Plasma

Tab.8

Auf- bzw. abgerundete Mittelwerte in Prozent der Normalwerte (100%) und gerundete Standardabweichungen von Faktor XIII im Plasma

	A1 (0h)	A2 (2h)	B (24h)	C (26h)	D (28h)	E (30h)
II	106 $\pm$ 18	91 $\pm$ 13	67 $\pm$ 13	55 $\pm$ 13	45 $\pm$ 7	30 $\pm$ 10
III	100 $\pm$ 0	92 $\pm$ 13	67 $\pm$ 13	59 $\pm$ 13	52 $\pm$ 12	45 $\pm$ 7
IV	100 $\pm$ 0	95 $\pm$ 11	75 $\pm$ 18	65 $\pm$ 14	58 $\pm$ 17	43 $\pm$ 7
V	100 $\pm$ 0	90 $\pm$ 14	80 $\pm$ 21	65 $\pm$ 14	63 $\pm$ 18	60 $\pm$ 21

2.7. Weitere Bestimmungen und Beobachtungen an Kontrolltieren, die nur Inhibitoren erhielten:

Die Bestimmung des Antiplasmingehalts im Plasma war teilweise unmöglich. Nach der 2.Endotoxingabe wurde das Plasma zunehmend hämolytisch oder stark hyperlipämisch. Selbst bei einer Verdünnung von 1:30, wie sie im Coatest Anti-plasmin von der Firma Kabi verwendet wird, war die Lösung der Proben B bis E milchig weiß. Die photometrische Extinktion bei 405 nm konnte nicht genau erfaßt werden. Auf eine Darstellung der Antiplasminwerte wird deshalb verzichtet. Beim Kaninchen spielt die Fibrinolyse eine untergeordnete Rolle, da dieses System nur schwach entwickelt ist.

Bei den Tieren, denen nur BBI injiziert wurde, nahmen die Leukozytenzahlen innerhalb des Normalbereichs zu. Der Fibrinogenspiegel stieg leicht an. Der prozentuale LFMK-Gehalt war normal bis leicht erhöht. AT III und Faktor XIII blieben während des gesamten Versuchsaufbaus im Normalbereich. Die Thrombozytenzahlen fielen ab.

Die Werte der Tiere, die nur Eglin erhalten hatten, unterschieden sich nicht von denen der unbehandelten Kaninchen des Normalkollektivs.

3. Pathologisch - morphologische Ergebnisse:

Die wichtigsten morphologischen Veränderungen beim Schock treten in Lunge, Leber und Niere auf.

Als charakteristische Korrelate des Schocks in den Organen wurden Endothelnekrosen, Mikrothromben und die Ansammlung von Granulozyten gewertet (5, 17).

Die Organe aller Tiere der Gruppen II, III, IV und V wiesen Zeichen des Endotoxinschocks auf. Keine Schock-symptome fanden sich bei den Tieren, die nur mit Inhibitor behandelt worden waren.

Die semiquantitative Auswertung der Befunde ergab leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Tab.9).

Da bei allen Gruppen gleichermaßen Granulozyten in den Schlingen der Nierenglomeruli und in den alveolären Kapillaren auftraten, wurden sie in der Tabelle nicht aufgeführt. Auf die Darstellung der Leberbefunde wurde zugunsten eines besseren Überblicks verzichtet, da sie kaum Unterschiede zeigen.

Die Mikrothromben und Endothelnekrosen in Niere und Lunge waren bei den mit Inhibitor und Endotoxin behandelten Tieren (III, IV und V) weniger ausgeprägt.

Tab.9

Semiquantitative Auswertung der histologischen Befunde in Niere und Lunge (Ø keine, + wenige, ++ viele, +++ sehr viele Veränderungen)

Histolog. Befund:	Gruppe II n=7				Gruppe III n=8				Gruppe IV n=6				Gruppe V n=6			
Niere	Ø	+	++	+++	Ø	+	++	+++	Ø	+	++	+++	Ø	+	++	+++
glom. Mikrothrombose	1			6	1	2	2	3	2		1	3	1			5
Epithelnekrosen	1			6	2	3	1	2	2	2		2	2			4
Lunge:																
Endothelnekrosen	1			6	1	5		2	1	3	1	2		6		
Mikrothromben			1	6		1	2	3	2	1	2	1	2	1	1	3

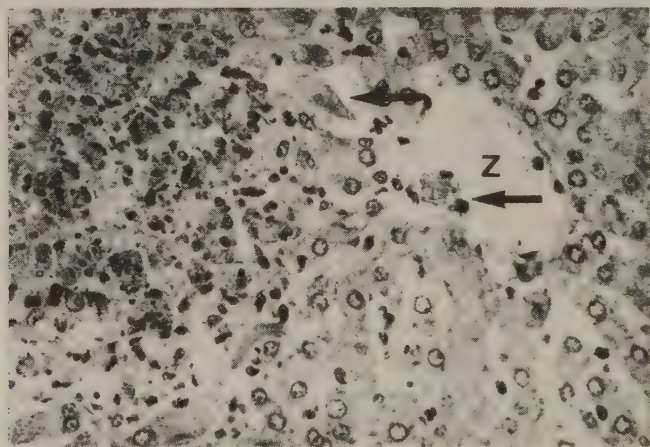


Abb.11 Endotoxinschock, Leber

Fibrinthromben in der Zentralvene (Z) und den Sinusoiden (Pfeile)
 In der linken Bildhälfte frische Leberzellnekrosen mit granulocytärer Reaktion. (Paraffinschnitt, HE, Vergrößerung 330x)

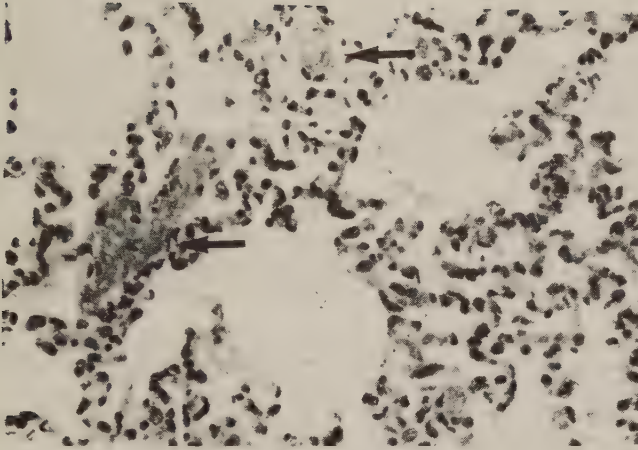


Abb.12 Endotoxinschock, Lunge
Fibrinthromben in den alveolären Kapillaren (Pfeile).
(Paraffinschnitt, HE, Vergrößerung 330x)

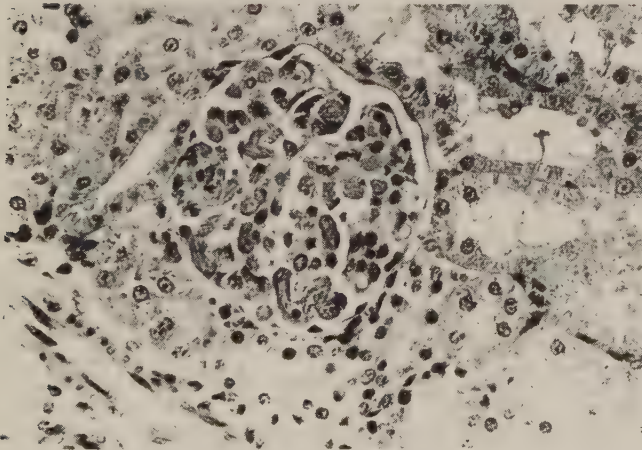


Abb.13 Endotoxinschock, Niere
Ausgeprägte glomeruläre Mikrothrombose
(Paraffinschnitt, PAS, Vergrößerung 330x)

D. Diskussion:

Das generalisierte Schwartzman-Phänomen wird definiert als Verschuß der glomerulären Kapillaren durch fibrinreiche Mikrothromben mit Ausbildung einer bilateralen Nierenrindennekrose (McKay 1963).

Ausgelöst wird das generalisierte Sanarelli-Schwartzman-Phänomen (SSP) durch die zweimalige Gabe von Endotoxin im Abstand von 24 Stunden.

Nach der ersten Endotoxininjektion treten vereinzelt intravasale Fibrinablagerungen in Lunge, Leber und Milz auf; erst nach der zweiten Injektion werden die für das SSP charakteristischen Mikrothromben in den Nierenglomeruli präzipitiert.

Endotoxin, ein der äußeren Bakterienwand anliegendes Lipopolysaccharid (15), greift in verschiedene Systeme des Organismus ein. Es schädigt das Endothel, aktiviert das Komplementsystem und blockiert das retikuloendotheliale System (RES). Durch Stimulation der Nebennieren führt es zur Ausschüttung von Kathecholaminen aus der Nebennierenrinde und setzt Kortikosteroide aus dem Nebennierenmark frei (13). Das geschädigte Endothel lockt Granulozyten an, aber auch Endotoxin selbst zieht die polymorphkernigen Leukozyten chemotaktisch an. Das Hängenbleiben der Granulozyten in der terminalen Strombahn ist eine Ursache der Leukopenie nach Endotoxingabe.

Mikroskopisch lassen sich in der Frühphase des Schocks charakteristischerweise massenhaft Granulozyten in den alveolären Kapillaren und in den Schlingen der Glomeruli nachweisen.

Die Granulozyten setzen unter Einwirkung von Endotoxin ihre proteolytischen Enzyme aus den azurophilen Granula frei. Die neutralen Proteasen aus den Leukozyten, zu

denen auch die Elastase zählt, sind in der Lage Plasmafaktoren (z.B. Fibrinogen und Faktor XIII), Kollagen, Elastin und andere strukturelle Glycoproteine der Matrix abzubauen (7).

Nach Aktivierung des Gerinnungs- und Kininsystems durch freigesetztes Thromboplastin aus Monozyten (8) tragen die granulozytären Enzyme durch Schädigung von Zellen und Bindegewebe zu einer Verstärkung der disseminierten intravaskulären Gerinnung bei.

Der Organismus schützt sich mit Hilfe natürlicher Inhibitoren, wie α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin, die die Elastase komplexartig binden und über das RES eliminieren. Im Endotoxinschock sind diese natürlichen Regulative durch die massive Ausschüttung überfordert.

Hier liegen die Möglichkeiten der Therapie mit Pharmaka, die die Proteolyse hemmen.

Eglin, der Proteaseninhibitor aus dem Blutegel, bot sich aufgrund seines kleinen Molekulargewichts (MG 6000) und wegen der hohen Stabilität in neutraler und schwach saurer Lösung und gegenüber unspezifischer Proteolyse an (22). Der Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) aus Sojabohnen besitzt ein Molekulargewicht von ca. 8000 und ist leicht zu isolieren; er ist daher für in vivo Modellversuche besonders geeignet (21).

Ein in vitro Vergleich der Hemmaktivitäten von Eglin bzw. BBI gegenüber Leukozytenelastase zeigte, daß Eglin bei gleicher Konzentration ungefähr 20mal stärker hemmte als BBI.

Die beiden Proteaseninhibitoren Eglin und BBI hemmen Trypsin, Chymotrypsin und die neutralen Granulozytenproteasen Elastase und Kathepsin G, nicht jedoch Thrombin und Plasmin.

Die klinische Situation beim Auftreten disseminierter

intravaskulärer Gerinnung bzw. eines septischen Schocks entspricht im Tiermodell dem Zeitpunkt nach der 2.Endotoxininjektion. Deshalb wurde BBI bzw. Eglin bei zwei Tiergruppen (III und IV) therapeutisch, d.h. kurz nach der 2.Endotoxininjektion gegeben. In einer weiteren Gruppe (V) wurde geprüft, ob das Auftreten des generalisierten SSP durch Eglin verhindert werden könnte; deshalb erhielten sechs Kaninchen Endotoxin und Eglin bei beiden Injektionen gleichzeitig. Die Eigenwirkung der Inhibitoren wurde an jeweils zwei Tieren untersucht. Als Kontrollgruppe diente eine Gruppe von acht Kaninchen (II), denen nur Endotoxin verabreicht wurde.

Alle Tiere, die Endotoxin erhalten hatten (Gruppe II - V), bildeten eine intravaskuläre Gerinnung aus mit einem für das SSP typischen Verlauf der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen. Endotoxin wirkt - wie bereits beschrieben - direkt auf die weißen Blutkörperchen. Es führt zu einem schnellen Abfall der Zahl der zirkulierenden Granulozyten, gefolgt von einer "Rebound"-Granulozytose. Der Abfall der Leukozytenzahlen ist unabhängig von der Aktivierung des Gerinnungssystems. Der gleiche Verlauf bei allen Gruppen wird hierdurch erklärt.

Der Abfall der Thrombozytenzahlen wird direkt durch Endotoxin hervorgerufen, er ist bereits 15 bis 30 Sekunden nach einer Endotoxininjektion nachweisbar (15). Die zunehmende Thrombozytopenie entwickelt sich aufgrund der Sekundäreffekte des Endotoxins. Das mag erklären, warum die Plättchenzahlen sich bei den behandelten Tieren nicht normalisierten, sondern ebenfalls weiter abfielen.

Der durch Endotoxin ausgelöste Entzündungsprozeß bewirkt einen Anstieg der Akut-Phasen-Proteine, wozu auch das Fibrinogen gehört. Gleichzeitig wird durch die Fibrinausfällung in Lunge, Milz und Leber Fibrinogen verbraucht. Nach der zweiten Endotoxingabe kommt es zu einer Abnahme des Fibrinogenspiegels, da ein erhöhter Verbrauch (Bil-

dung von Mikrothromben in der Niere) die Synthese überwiegt.

Bei den Tieren, die gleichzeitig Endotoxin und Eglin erhielten, wurde dagegen kein Anstieg des Fibrinogens beobachtet. Dies beruht möglicherweise auf der entzündungshemmenden Wirkung der Inhibitoren (24).

Neben der Fibrinausfällung wird Fibrinogen auch zunehmend durch Entstehen von löslichen Fibrinmonomerkomplexen verbraucht, die als lösliche Vorstufen der Fibrinniederschläge betrachtet werden können. Lösliches Fibrin wird in der Zirkulation durch aktiviertes Thrombin und Plasmin aus Fibrinogen gebildet und durch Komplexbildung mit Fibrinogen in Lösung gehalten. Sein Spiegel kann als direkter Ausdruck der Thrombinaktivierung betrachtet werden. Diese LFMK werden normalerweise durch das RES entfernt, da Endotoxin jedoch das RES blockiert, kommt es zu einer verstärkten Polymerisation mit Bildung von Mikrogerinnseln. LFMK stiegen in allen vier Gruppen von Anfang an signifikant an. Die mit Proteaseninhibitoren behandelten Gruppen wichen nicht signifikant von der Kontrollgruppe an. Eine Beeinflussung war auch nicht zu erwarten, da Eglin und BBI keine Hemmaktivität gegenüber Thrombin besitzen. Dagegen war durch Hirudin, einem thrombinspezifischen Hemmstoff, der wie Eglin aus dem Blutegel stammt, eine signifikante Verminderung des LFMK-Anstiegs beobachtet worden (10).

Der Faktor XIII-Gehalt nahm im Plasma aller vier Gruppen signifikant ab. Bei den Tiergruppen, die mit Eglin und BBI behandelt worden waren, war die Abnahme in den letzten zwei Stunden des Versuchs signifikant geringer. Bei den Kontrolltieren betrug der Abfall 75 %, bei den einmal behandelten Tieren nur 55 % und bei den zweimal behandelten Tieren sogar nur 40 %. Der Faktor XIII wird durch Thrombin aktiviert und dient zur Stabilisierung von Fibrin. Das fördert physiologischerweise die Wundheilung.

Bei intravaskulärer Gerinnung festigt es unerwünschterweise die Thromben. Diese generalisierte Aktivierung wird durch natürliche Regulationsmechanismen inaktiviert und eliminiert, was einen starken Abfall dieses Faktors im Plasma bedingt. Zusätzlich bauen beim Endotoxinschock die freigesetzten Leukozytenproteasen Faktor XIII ab. Dieser unspezifische Abbau des Gerinnungsfaktors wird durch die zugeführten Inhibitoren gehemmt. Dadurch kann der geringere Abfall bei den mit BBI und Eglin behandelten Tieren erklärt werden.

Ein wichtiger plasmatischer Inhibitor ist das in der Leber synthetisierte Antithrombin III. Dieses Protein kontrolliert das Gleichgewicht des Gerinnungssystems und verhindert unter physiologischen Bedingungen das Entstehen von Thrombosen. Gerinnungsaktive Proteasen, die im Blut zirkulieren, können durch den natürlichen Inhibitor inaktiviert werden: z.B. Thrombin, die Faktoren Xa, IXa, XIa, XIIa und Kallikrein. Schon ein geringer Abfall des AT III-Spiegels erhöht das Thromboserisiko. Heparin, zur Thromboseprophylaxe gegeben, wirkt über eine Verstärkung des AT III, indem es mit diesem einen Komplex bildet, der die Inhibitions geschwindigkeit erhöht.

Bei der durch Endotoxin verursachten disseminierten intravaskulären Gerinnung fallen die AT III-Werte linear ab. Bei den nur mit Endotoxin behandelten Tieren fiel der AT III-Spiegel auf 65 % des Ausgangswertes ab. Der Abfall war stark signifikant ($p < 0,0001$). Unter Eglin- bzw. BBI-Behandlung war dagegen kein signifikanter Abfall zu beobachten.

Bei dem Versuch den Abfall des AT III durch Komplexbildung mit aktivierten Gerinnungsfaktoren zu erklären, stößt man dadurch auf Schwierigkeiten, daß in Gegenwart von Inhibitoren, die die aktivierten Gerinnungsfaktoren nicht zu hemmen vermögen, kein Abfall erfolgt. Man ist daher gezwungen nach neuen Erklärungen zu suchen.

Hierbei kommen Untersuchungen von Jochum et al. (11) zu

Hilfe, die zeigte, daß AT III sehr stark einer unspezifischen Proteolyse durch Leukozytenproteasen unterliegt. Wenn daher bei den Inhibitor-behandelten Tieren kein AT III-Abfall auftritt, obwohl auch bei diesen Tieren die Gerinnungsfaktoren aktiviert werden, so darf man daraus schließen, daß AT III auch bei den nur Endotoxin-behandelten Tieren Überwiegend durch einen unspezifischen Leukozytenproteasenabbau und nur untergeordnet durch Komplexbildung mit aktive Gerinnungsfaktoren verringert wird.

Um kurz zusammenzufassen:

Die beiden Proteaseninhibitoren zeigten keine Wirkung auf das endotoxininduzierte Verhalten von Leukozyten und Thrombozyten. Sie beeinflussen den Verlauf der DIG direkt - über die Hemmung der unspezifischen Proteolyse von Gerinnungsfaktoren durch granulozytäre Proteasen (z.B. Faktor XIII, AT III) - und indirekt - über eine Entzündungshemmung (auf Fibrinogen).

Die hämatologischen Ergebnisse werden durch die pathologisch-morphologischen Befunde bestätigt.

Die in Lunge und Niere beobachtete Ansammlung von Granulozyten in der terminalen Strombahn beruht auf einem direkten Endotoxineffekt und lies sich daher durch die Proteaseninhibitoren nicht beeinflussen.

Endothelnekrosen lassen sich in den Organen der Tiere der Gruppen II - V nachweisen. Sie sind jedoch unter Inhibitorbehandlung weniger ausgeprägt. Primär durch Endotoxin induzierte Endothelläsionen entziehen sich der Inhibitortherapie. Die Verringerung der Schäden deutet auf einen Schutz des Endothels durch Inhibitoren vor dem sekundären Angriff durch freigesetzte Leukozytenproteasen hin.

Unter Proteaseninhibitoren treten weniger Mikrothromben auf. Die Bildung von Thromben wird durch das Zusammenspiel dreier Faktoren ermöglicht, nämlich Veränderungen

der Gefäßwand, der Blutzusammensetzung und der Blutströmung. Eglin und BBI greifen in dieses System ein, indem sie den proteolytischen Abbau von AT III hemmen und das Endothel schützen. Auf diese Weise können sie die Entstehung von Thromben zwar reduzieren, aber nicht verhindern, da sie keinen Einfluß auf die Präzipitation von Fibrin durch Endotoxin besitzen.

In dieser Untersuchung über die Wirkung von Proteaseninhibitoren beim Sanarelli-Schwartzman-Phänomen des Kaninchens konnte gezeigt werden, daß Eglin und BBI den unspezifischen Abbau plasmatischer Gerinnungsfaktoren durch Granulozytenproteasen und den entzündungsbedingten Anstieg von Akut-Phasen-Proteinen verhindern.

E. Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wurde die Wirkung zweier Proteaseninhibitoren, Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) aus Sojabohnen und Eglin aus Blutegeln, am generalisierten Schwartzman-Phänomen des Kaninchens untersucht.

Um die intravaskuläre Gerinnung auszulösen, erhielten alle Tiere zwei Endotoxininjektionen im Abstand von 24 Stunden.

Zwei Gruppen (III, IV) bekamen die Inhibitoren "therapeutisch", d.h. nach der 2. Endotoxininjektion. Bei einer Gruppe (V) wurde der Inhibitor gleichzeitig mit Endotoxin gegeben. Der Kontrollgruppe (II) wurde nur Endotoxin injiziert.

Bei den Kontrolltieren wurden alle typischen Zeichen des Sanarelli-Schwartzman-Phänomens beobachtet, wie Leukopenie und anschließende Leukozytose, zunehmende Thrombozytopenie, Abfall von Gerinnungsfaktoren, Anstieg der löslichen Fibrinmonomerkomplexe (LFMK's) und Anstieg und Abfall des Fibrinogens.

Parallel zu diesen hämatologischen Ergebnissen entwickelten sich in den Schockorganen Lunge, Leber und Niere Mikrothrombosen und Endothelnekrosen. In den alveolären und glomerulären Kapillaren sammelten sich vermehrt Granulozyten an.

Unter Inhibitorgabe traten diese pathologisch-anatomischen Schockkorrelate in den Organen weniger ausgeprägt auf. BBI und Eglin konnten den proteolytischen Abbau von Gerinnungsfaktoren (Faktor XIII, AT III) und den entzündungsbedingten Anstieg der Akut-Phasen-Proteine (insbesondere Fibrinogen) verhindern. Auf die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen, sowie den LFMK-Spiegel hatten die Inhibitoren jedoch keinen Einfluß.

F. Literatur:

- (1) Apitz, K.:
A study of the generalized Schwartzman-Phenomenon
I.Immun. 29, 255 - 266, 1935
- (2) v.Bary, S.:
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Wund-
heilkunde des Dickdarms unter besonderer Berücksichti-
gung der gewebeständigen Fibrinolyse und Kollagenolyse
Habilitationsschrift an der Medizin. Fakultät der LMU
München, 1979
- (3) Beller, F.K.:
The role of endotoxin in disseminated intravascular
coagulation
in: Disseminated intravaskular coagulation
(Hrsg: E.F. Mammen, G.F. Anderson and M.J. Barnhardt)
F.K.Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York, 1969, 125-149
- (4) Bieth, J., Spiess, B. und Wermuth, C.G.:
The synthesis and analytical use of a highly sensitive
and convenient substrate of elastase
Biochem.Med. 11, 350 - 357, 1974
- (5) Eder, M. und Gedigk, P.:
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der patholo-
gischen Anatomie
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975, 101-104
- (6) Hafter, R. und Graeff, H.:
Estimation of soluble fibrin monomer complexes by
agarose gel filtration
in: Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis
(Hrsg: J.F. Davidson, M.M. Samama and P.C. Desnoyers)
Raven Press, New York, 1976, 137 - 149

- (7) Havemann, K. und Janoff, A.:
Neutral proteases of human polymorphnuclear leukocytes
Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978

- (8) Hiller, E., Saal, J.G., Ostendorf, P. und Griffiths, G.W.:
The procoagulant activity of human granulocytes,
lymphocytes and monocytes stimulated by endotoxin
Klin.Wschr. 55, 751-757, 1977

- (9) Ishikawa, A., Hafter, R. und Graeff, H.:
The effect of heparinized blood exchange transfusion
on endotoxin induced disseminated intravaskular
coagulation (DIC)
J.Perinat.Med. 7, 250-256, 1979

- (10) Ishikawa, A., Hafter, R., Seemüller, U., Gokel, J.M.
und Graeff, H.:
The effect of hirudin on endotoxin induced disseminated
intravascular coagulation (DIC)
Thrombos.Research 19, 351 - 358, 1980

- (11) Jochum, M., Lander, S., Heimbürger, N. und Fritz, H.:
Effect of human granulocytic elastase on isolated
human Antithrombin III
im Druck: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.

- (12) Kuhn, W. und Graeff, H.:
Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1977

- (13) McKay, D.G.:
Vessel Wall and thrombogenesis - Endotoxin
Thrombos.Diathes.haemorrh. 29, 11-26, 1973

- (14) Morse, J.O.:
Alpha₁-Antitrypsin deficiency
The New England J.Med. 299, 1045-1048, 1099-1105, 1978
- (15) Müller-Berghaus, G. und Lasch, H.G.:
Microcirculatory disturbances induced by generalized
intravascular coagulation
in: Handbook of experimental pharmacology
(Hrsg: J.Schmier, O.Eichler)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975,
Vol,XVI /3, 429-502
- (16) Rick, W.:
Klinische Chemie und Mikroskopie, eine Einführung
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1973, 101-103
- (17) Riede, U.N., Mittermayer, Chr., Horn, R., Friedburg, H.
und Sandritter, W.:
Funktionelle Pathologie der menschlichen Schocklunge
Med.Welt 31, 491-501, 1980
- (18) Romeis, B.:
Mikroskopische Technik
R.Oldenbourg, München, 1948 und 1968
- (19) Sachs, L.:
Statistische Auswertungsmethoden
Springer-Verlag, Berlin-Heidelber-New York, 1972
- (20) Schiessler, H., Arnhold, M., Ohlsson, K. und Fritz, H.:
Inhibitors of acrosin and granulocyte proteinases
from human genital tract secretions
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 1251-1269, 1976

- (21) Schiessler, H., Ohlsson, K., Olsson, J., Arnhold, M.
Birk, Y. und Fritz, H.:
Elastase from human and canine granulocytes
II. Interaction with proteaseinhibitors of animal,
plant and microbial origin
Hoppe Seyler's Z.Physiolog.Chem. 358, 53 - 58, 1977
- (22) Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.P.
und Fritz, H.:
Isolation and characterisation of a low molecular
weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulo-
cytic elastase and cathepsin G) from leeches
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 1105 - 1117, 1977
- (23) Schwartzman, G.:
Phenomenon of local skin reactivity to culture
filtrates of various mikroorganisms
Proc.Soc.Exp.Biol. and Med. 26, 207 - 208, 1928/9
- (24) Vogel, R., Trauschold, J., Werle, E.:
Natürliche Proteinase-Inhibitoren
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1966, 29
- (25) Witte, J.:
Endotoxinämie und hyperdynamer septischer Schock
Pathobiochemie ausgewählter Gerinnungs- und anderer
Plasmaproteinparameter
Habilitationsschrift an der med. Fakultät der LMU
München 1979

Lebenslauf

Name	Barbara Pfost
Geburtsdatum	22.05.1954
Geburtsort	Ulm an der Donau
Eltern	Jörg Pfost, Dipl.-Ing.agr., tödlich verunglückt am 7.08.1979 Waltraud Mechtild Pfost, geborene Stockmann
Schulbesuch:	
1960 - 1965	Besuch der Volksschule
1965 - 1968	Gymnasium "Klosterschule" in Hamburg
1968 - 1973	Maximiliansgymnasium in München
Juni 1973	Abitur am Maximiliansgymnasium
Studium:	
1973 - 1979	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München
Praktische Tätigkeit:	
1972, 1973, 1974	Dienst als Schwesternhelferin
1976, 1977, 1978	Famulaturen in München und Iller- tissen
Praktisches Jahr:	
Okt. 78 - Feb. 79	Ausbildung in Gynäkologie und Geburtshilfe in der I. Frauen- klinik der Universität München
Feb. 79 - Mai 79	Ausbildung in Innerer Medizin im Städtischen Krankenhaus Landshut
Juni 79 - Sept. 79	Ausbildung in Chirurgie im Städtischen Krankenhaus München-Schwabing
April 1980	Ärztliche Prüfung
seit Sommer 1979	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. H. Graeff
seit 1.11.1980	Assistenzärztin an der I. Frauen- klinik der Universität München

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Zander danke ich für die großzügige Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Graeff danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die ständige persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. J. M. Gokel danke ich für die histologische Auswertung.

Herr Dr. R. Hafter fand stets Zeit für mich, um wissenschaftliche Probleme zu diskutieren, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Für die freundliche Überlassung der Inhibitoren danke ich Frau Dr. M. Jochum und Frau Dr. U. Seemüller.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Zahn bedanken, der die Tiere während der Versuche versorgte.



